

# HPLC 法同时测定复方姜黄微囊中姜黄素和胡椒碱的含量

毕晓黎\*, 孙冬梅, 罗文汇, 胥爱丽  
(广东省中医研究所, 广东 广州 510095)

**[摘要]** 目的: 采用反相高效液相色谱法测定复方姜黄微囊中姜黄素和胡椒碱的含量。方法: 以乙腈-3% 磷酸水溶液(40:60)为流动相, Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)为固定相, 流速为 0.7 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长为 425 nm, 343 nm。结果: 姜黄素在 0.073 44 ~ 0.367 20 μg 之间、胡椒碱在 0.003 39 ~ 0.016 95 μg 之间呈线性关系, 回收率分别为 97.84% 和 97.40%, RSD 分别为 1.80% 和 1.03%。结论: 该方法简单, 灵敏度高, 可用于复方姜黄微囊中姜黄素和胡椒碱的含量检测。

**[关键词]** 复方姜黄微囊; 高效液相; 姜黄素; 胡椒碱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0020-03

复方姜黄微囊是将姜黄素和胡椒碱以壳聚糖和海藻酸钠为囊材包裹而成的复方微囊制剂。为有效地控制该制剂的质量, 采用 HPLC 法同时测定制剂中姜黄素和胡椒碱的含量, 经方法学研究, 姜黄素和胡椒碱在所选用测定条件下能够得到较好地分离, 检测灵敏度高, 测定专属性强, 阴性无干扰, 可以作为该制剂的含量测定控制指标。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, 四元梯度泵, G2170AA 数据处理系统, Satorius BP211D 电子分析天平。

姜黄素对照品(批号: 110823-980)、胡椒碱对照品(批号: 110775-200)购于中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。复方姜黄微囊由广东省中医研究所自制。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 检测波长: 425 nm, 343 nm; 流速: 0.7 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 20 °C; 流动相: 乙腈-3% 磷酸水溶液(40:60)。理论塔板数分别按姜

黄素峰和胡椒碱峰计算均不应低于 3 000。

**2.2 姜黄素和胡椒碱对照品溶液的制备** 精密称取姜黄素和胡椒碱对照品适量, 分别置棕色量瓶中, 加甲醇分别配制成姜黄素对照品储备液(0.734 4 mg · mL<sup>-1</sup>)和胡椒碱对照品储备液(0.033 9 mg · mL<sup>-1</sup>); 分别精密量取姜黄素对照品储备液和胡椒碱对照品储备液, 置棕色量瓶中, 加甲醇配制成姜黄素和胡椒碱对照品混合溶液(含姜黄素 22.032 μg · mL<sup>-1</sup>和胡椒碱 1.017 μg · mL<sup>-1</sup>)。

**2.3 供试品溶液的制备** 取复方姜黄微囊约 20 mg, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠-乙醇(80:20)溶液 20 mL, 称定重量, 置恒温振荡器中, 在(37 ± 1) °C, 80 r · min<sup>-1</sup> 条件下振荡至微囊全部溶散, 冷却至室温, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀。精密量取提取液 1 mL, 经固相小柱萃取处理(先用甲醇 5 mL 活化固相萃取小柱, 再用蒸馏水 5 mL 冲洗平衡, 然后上样), 用甲醇 15 mL 洗脱, 洗脱液置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得供试品溶液。

**2.4 阴性干扰试验** 取空白微囊样品 20 mg, 按供试品溶液的制备项下制得阴性对照溶液。分别精密吸取姜黄素和胡椒碱混合对照品溶液 10 μL、供试品溶液与阴性溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 按照设定的色谱条件进行测定。结果阴性样品色谱在姜黄素和胡椒碱相应的位置上无吸收峰, 表明阴

**[收稿日期]** 2009-04-28

**[基金项目]** 广东省科技厅火炬计划项目 治疗高脂血症新药—复方姜黄缓释微囊剂的研制开发(2005A30101016)

**[通讯作者]** \* 毕晓黎, Tel: (020) 83501292; Email: bxl1130@yahoo.com.cn

性样品对测定无干扰。见图1~6。

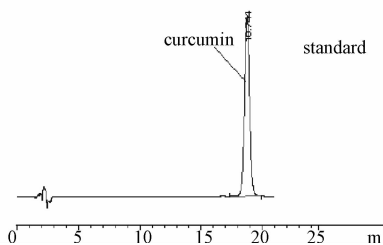


图1 姜黄素对照品色谱图(425 nm)

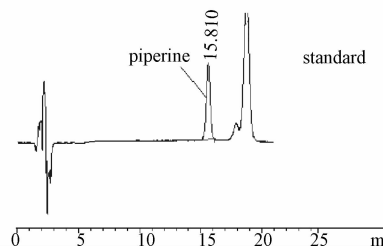


图2 胡椒碱对照品色谱图(343 nm)

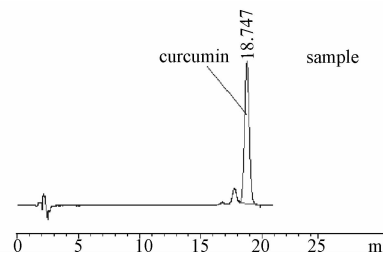


图3 供试品姜黄素色谱图(425 nm)

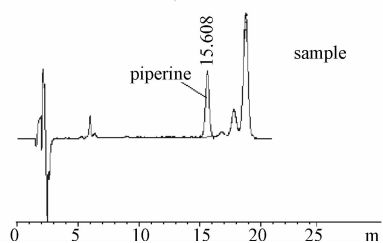


图4 供试品胡椒碱色谱图(343 nm)

**2.5 线性关系考察** 精密量取姜黄素对照品储备液( $0.7244 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和胡椒碱对照品储备液( $0.0339 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )各1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置棕色量瓶中, 加入甲醇配制成每1 mL 分别含姜黄素7.344  $\mu\text{g}$ 和胡椒碱0.339  $\mu\text{g}$ 、姜黄素14.688  $\mu\text{g}$ 和胡椒碱0.678  $\mu\text{g}$ 、姜黄素22.032  $\mu\text{g}$ 和胡椒碱1.017  $\mu\text{g}$ 、姜黄素29.376  $\mu\text{g}$ 和胡椒碱1.356  $\mu\text{g}$ 、姜黄素36.720  $\mu\text{g}$ 和胡椒碱1.695  $\mu\text{g}$ 的对照品混合溶液。

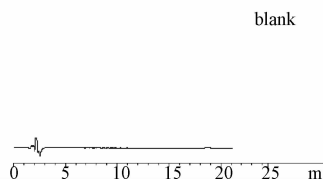


图5 阴性对照色谱图(425 nm)

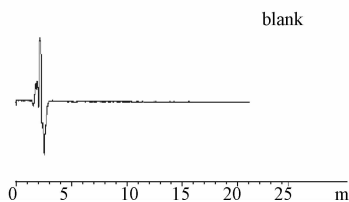


图6 阴性对照色谱图(343 nm)

精密吸取上述溶液各10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按照设定的色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标( $Y$ ), 进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标( $X$ ), 绘制标准曲线。姜黄素的回归方程为:  $Y = 4900.77X - 16.81$ ,  $r = 0.9999$ ; 胡椒碱的回归方程为:  $Y = 7399.21X + 11.14$ ,  $r = 0.9998$ 。结果表明姜黄素在0.07344 ~ 0.36720  $\mu\text{g}$ 之间呈良好的线性关系, 胡椒碱在0.00339 ~ 0.01695  $\mu\text{g}$ 之间呈良好的线性关系。

**2.6 精密度试验** 精密吸取姜黄素和胡椒碱对照品混合溶液( $22.032 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.017 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 依法测定, 连续进样6次, 测定峰面积。结果表明: 姜黄素和胡椒碱的峰面积相对标准偏差(RSD)分别为0.41%和1.90%, 均小于2%, 说明精密度良好。

**2.7 重复性试验** 取复方姜黄微囊5份, 按上述供试品溶液的制备方法处理。分别精密吸取供试品溶液各20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 依法测定。结果表明: 姜黄素和胡椒碱的平均含量分别为24.14%和1.29%, 相对标准偏差(RSD)分别为1.58%和1.79%, 均小于2%, 说明重复性良好。

**2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定峰面积。结果表明: 姜黄素和胡椒碱的峰面积相对标准偏差(RSD)分别为0.62%和1.70%, 均小于2%, 说明供试品在10 h 内具有良好的稳定性。

**2.9 回收率试验** 精密称取已知含量样品6份, 每份约10 mg, 置50 mL 具塞锥形瓶中, 分别加入一定

量姜黄素对照品和胡椒碱对照品,按供试品溶液的制备方法处理,依法测定。结果表明:姜黄素和胡椒碱的平均回收率分别为 97.84% 和 97.40%,回收率相对标准偏差(RSD)分别为 1.80% 和 1.03%,均小于 2%,说明本法具有良好的回收率。见表 1~2。

表 1 制剂中姜黄素加样回收率试验

编号	样品中姜黄素含量(mg)	加入姜黄素量(mg)	实测量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	2.791	2.400	5.202	100.46	97.84	1.80
2	2.641	2.400	4.937	95.67		
3	2.612	3.000	5.585	99.10		
4	2.677	3.000	5.605	97.60		
5	2.711	3.600	6.235	97.89		
6	2.735	3.600	6.203	96.33		

表 2 制剂中胡椒碱加样回收率试验

编号	样品中胡椒碱含量(mg)	加入胡椒碱量(mg)	实测量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	0.149	0.120	0.267	98.33	97.40	1.03
2	0.141	0.120	0.258	97.50		
3	0.139	0.150	0.283	96.00		
4	0.143	0.150	0.291	98.67		
5	0.145	0.180	0.319	96.67		
6	0.136	0.180	0.311	97.22		

**2.10 样品测定结果** 取 3 批复方姜黄微囊各 2 份,按上述供试品溶液的制备方法处理。分别精密吸取供试品溶液各 20  $\mu$ L、对照品溶液 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,依法测定,结果见表 3。

表 3 样品含量测定(n=2)

样品号	姜黄素含量(%)	胡椒碱含量(%)
1	24.14	1.29
2	25.37	1.36
3	24.78	1.31
平均	24.76	1.32

### 3 讨论

微囊中药物含量的测定一般采用溶剂提取法<sup>[1-3]</sup>,曾考察采用有机溶剂如甲醇、乙醇、丙酮等进行提取,但在这些溶剂中微囊仅发生皱缩,并不溶散。后进行试验研究发现,采用 0.05mol·L<sup>-1</sup>柠檬酸钠溶液可使海藻酸钠-壳聚糖微囊全部溶蚀,又考

虑到姜黄素和胡椒碱均不溶于水而溶于醇的性质,最终采用 0.05mol·L<sup>-1</sup>柠檬酸钠-乙醇(80:20)溶液作为提取溶剂,恒温振荡至微囊全部溶散,提取效果较好。壳聚糖和海藻酸钠均为大分子物质,若提取液直接进样,会对色谱柱造成损害。因此,将提取液经固相小柱萃取处理,用甲醇洗脱,可以达到较好的纯化目的。

**3.1 检测波长的确定** 分别对姜黄素和胡椒碱进行紫外扫描,确定其最大吸收波长,结果姜黄素的最大吸收波长为 425 nm,胡椒碱的最大吸收波长为 343 nm。由于供试品中胡椒碱的浓度较低,色谱峰面积较小,因此需在最大波长处进行测定。姜黄素在 343 nm 处虽然也有吸收,但其色谱峰有干扰,其分离度 < 1.5,无法达到基线分离,因此采用 DAD 检测器,同时在 425 nm 和 343 nm 分别对姜黄素和胡椒碱进行测定。

**3.2 色谱柱的确定** 分别比较了 C<sub>8</sub> 柱和 C<sub>18</sub> 柱对姜黄素的分析效果,在其他分析条件相同时,姜黄素在 C<sub>8</sub> 柱上的保留时间较 C<sub>18</sub> 柱短,出峰快,且对称性更好,没有 C<sub>18</sub> 柱的拖尾现象。这可能是由于键合烷基的链长对键合相的样品负荷量、溶质的容量因子及其选择性有不同的影响,当烷基键合相表面浓度相同时,随着烷基链长增加,碳含量成比例增加,溶质的保留值增加。八烷基键合相(C<sub>8</sub>)短链烷基,由于分子尺寸较小,与硅胶表面键合时可以有比长链烷基更高的覆盖和较少的残余羟基,更适合极性样品的分析。

方法学考察结果表明,在该色谱条件下姜黄素和胡椒碱的色谱峰可以达到较好的分离,阴性无干扰,方法的精密性、稳定性、重现性和加样回收试验均符合要求,该方法可以作为复方姜黄微囊中姜黄素和胡椒碱的含量测定方法。

### [参考文献]

[1] 李文杰,李国清,林丽英. 姜黄素的提取、分离与测定[J]. 海峡药学,2007,19(4):31.  
[2] 陈振江,殷丹. 姜黄素胶原微球的质量标准研究[J]. 湖北中医学院学报,2007,9(3):43.  
[3] 潘振华,刘焕龙,向柏. 姜黄素缓释微囊的制备工艺研究[J]. 中成药,2007,29(9):1302.